

B19

APPARATUS FOR INTRODUCING GENE FOR SUCH

Patent Number: JP62171687
Publication date: 1987-07-28
Inventor(s): SOGAWA KOJI; others: 05
Applicant(s): SHIMADZU CORP
Requested Patent: ☐ JP62171687
Application Number: JP19850297866 19851228
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N13/00; C12M1/00; C12N15/00
EC Classification:
Equivalents: JP1925472C, JP6055143B

Abstract

PURPOSE:To improve introducing efficiency of gene, etc., by arranging plate electrodes in square shape, and connecting the electrodes with an AC power source to intermittently imposing AC electric field having different phases to a pair of opposite electrodes and with a DC power source.

CONSTITUTION:Pairs of opposite electrodes 10a, 10b, 12a and 12b are imposed with an AC electric field to rotate cells and them imposed with a DC electric field E to increase the permeability of cell membrane in a region making an angle theta of 0 or pi radian between the DC electric field E. Subsequently, an AC electric field is imposed to the opposite electrodes 10a, 10b, 12a and 12b to rotate the cell and again a DC electric field is imposed to increase the permeability of cell membrane different from the region of the previous treatment. The permeability of the cell can be increased at plural points by repeating the operation comprising the rotation of the cell and imposition of DC electric field. The introduction efficiency of gene, etc., can be improved by this process.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭62-171687

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)7月28日

C 12 N 13/00

7823-4B

C 12 M 1/00

8114-4B

C 12 N 15/00

7115-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 遺伝子等の導入装置

⑯ 特 願 昭60-297866

⑰ 出 願 昭60(1985)12月28日

⑱ 発 明 者 十 川 好 志 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 発 明 者 今 井 克 行 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑳ 発 明 者 戸 田 健 三 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

㉑ 発 明 者 高 山 慎 一 郎 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

㉒ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都市中京区西ノ京桑原町1番地

㉓ 代 理 人 弁理士 野口 繁雄

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

遺伝子等の導入装置

2. 特許請求の範囲

(1) 細胞と遺伝子等を混合した懸濁液が收容される領域を挟んで対向辺が互いに平行になるように四辺形状に平板電極が配置されており、

2個の対向電極対の間には互いに位相が $\pi/2$ ラジアン異なる交流電界を間欠的に印加する交流電源装置と、交流電界が印加されていない時に対向電極間に直流電界を印加する直流電源装置とが接続されていることを特徴とする遺伝子等の導入装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、細胞に電気パルスを与えることによって、細胞外に浮遊している遺伝子や高分子物質

(遺伝子等という)を細胞内に取り込ませるための装置に関するものである。

(従来の技術)

第3図に概略的に示されるように、対向電極2, 4間に細胞6を置き、電極2, 4間に電界Eを印加したとする。電界Eの方向と細胞6の表面上の任意の点Qとのなす角を θ とすると、細胞膜当り、近似的に $V = (3/2) r E \cos \theta$ なる電位差Vが生じることが知られている。rは細胞6の半径である。

この電位差Vが0.5~3ボルトになると、細胞膜の透過性が増加して、細胞6外に浮遊している遺伝子等が細胞6内に取り込まれる。

(発明が解決しようとする問題点)

細胞膜に作用する電位差Vは、細胞表面上の点Qのなす角度 θ の増加に伴って低下し、

$\theta = n\pi/2$ ($n=1, 3$) で $V=0$ となる。したがって遺伝子等が導入されるのは、図中でP, Sで示されるような細胞表面上の特異な領域($\theta=0, \pi$)に限られる。

この遺伝子等の導入領域を増加させるためには、電界Eを大きくすればよいが、その場合、P, S点においては電位差Vが大きくなり過ぎるために、

細胞膜の完全破壊が起り、続いて細胞死に至る。

本発明は、細胞膜の特定の部分に電気エネルギーの集中が起こらないようにするとともに、遺伝子等が細胞内に取り込まれる確率を高めることができる遺伝子等の導入装置を提供することを目的とするものである。

(問題点を解決するための手段)

本発明の装置は、細胞膜の特定部分への電気エネルギー集中を避けるために、細胞を回転させ、細胞表面に電圧ができるだけ均一に印加されるようにするものである。

すなわち、実施例を示す第1図を参照して説明すると、本発明の遺伝子等の導入装置では、細胞と遺伝子等を混合した懸濁液が収容される領域を挟んで対向辺が互いに平行になるように四辺形状に平板電極(10a, 10b, 12a, 12b)が配置されており、2個の対向電極対(10a, 10b,), (12a, 12b)の間には互いに位相が $\pi/2$ ラジアン異なる交流電界が間欠的に印加されるとともに、交流電界が印加されてい

ない時に対向電極間に直流電界が印加されるように構成される。

(作用)

対向電極対(10a, 10b)と(12a, 12b)の間に互いに位相が $\pi/2$ ラジアンだけ異なる交流電界を印加すると、両電極対で挟まれた領域に置かれた細胞は回転する(例えば、J.Membrane Biol.誌、82巻、157~166頁(1984年)参照)。

対向電極対(10a, 10b,), (12a, 12b)に交流電界を印加して細胞を回転させた後、直流電界Eを印加してその直流電界Eとのなす角度 θ が0, π ラジアンとなる領域の細胞膜の透過性を増加させる。

続いて再び対向電極対(10a, 10b,), (12a, 12b)に交流電界を印加して細胞を回転させた後、直流電界Eを印加して、今度は前回とは異なる領域の細胞膜の透過性を増加させる。

このように細胞を回転させた後、直流電界を印加する動作を繰り返すことにより、細胞表面上の

複数の点での透過性が増加し、遺伝子等の導入効率が高くなる。

(実施例)

第1図は一実施例を電気系統図とともに示す概略平面図、第2図は同実施例におけるチャンバーを示す側面図である。

8は細胞及び遺伝子を混合した懸濁液を入れるチャンバーである。チャンバー8は、2対の平行平板電極(10a, 10b,), (12a, 12b)及び電気絶縁物14a~14dによって四方を囲まれている。また、底板16とカバー18は透明な電気絶縁物で構成されており、顕微鏡によってチャンバ8内部の観察ができるようになっている。底板16、電極10a, 10b, 12a, 12b及び4個所の絶縁物14a~14dは相互に密着しており、懸濁液が洩れない構造となっているが、カバー18は取外しが可能である。

14はスイッチJ2を介して一対の対向電極対10a, 10bに細胞回転用交流電界を印加する交流電源、16はスイッチJ1を介して一対の対

向電極対12a, 12bに細胞回転用交流電界を印加する交流電源であり、両交流電源14, 16の位相は互いに $\pi/2$ ラジアンだけ異なっている。

18は遺伝子導入用の直流パルス電源であり、スイッチJ2とJ3を介して一対の対向電極10a, 10bと接続され、スイッチJ1とJ3を介して一対の対向電極12a, 12bと接続されるようになっている。直流パルス電源18の電圧とパルス幅は任意に選択できるようになっている。

これらの電源14, 16, 18は、回路制御器20の指令に従ってスイッチJ1, J2, J3によって切り換えられて電極10a, 10b, 12a, 12b間に所定の電界を生ずる。

本実施例の電界印加手順の一例を下記に示す。

なお、以下に示すスイッチの接続記号JA-Bは、スイッチJAがB回路に接続されることを示す。

(1) J1-1, J2-1, J3-2によって細胞を回転させる。

(2) J1-3, J2-2, J3-3によって電

極12a, 12b間に直流パルスを印加する。この時、電極10a, 10b間に電流は流れない。

(3) J1-2, J2-3, J3-1によって電極10a, 10b間に直流パルスを印加する。この時、電極12a, 12b間に電流は流れない。

(4) 再度(1)~(3)を繰り返す。

顕微鏡下で、近似的に球形な対象物を観察する際に、視野の裏側を観察したい場合には、本装置の交流電界印加手段のみを作動させて対象物を回転させ、直流パルス印加手段を作動させないようにすればよい。

(発明の効果)

本発明の装置では、交流電界により細胞を回転させた後に直流電界を印加して遺伝子等の導入を図っている。そのため、次のような効果を達成することができる。

(1) 細胞膜の透過性が増加する膜上の面積を大きくすることが可能であり、結果的に、遺伝子等の導入効率を高めることができる。

(2) 細胞を非接触で回転させることができるた

めに、細胞自体に機械的なストレスが与らない。

4. 図面の簡単な説明

第1図は一実施例を電気系統図とともに示す概略平面図、第2図は同実施例におけるチャンバーを示す側面図、第3図は細胞と電界との関係を示す概略図である。

8……チャンバー、

10a, 10b, 12a, 12b……平板電極、

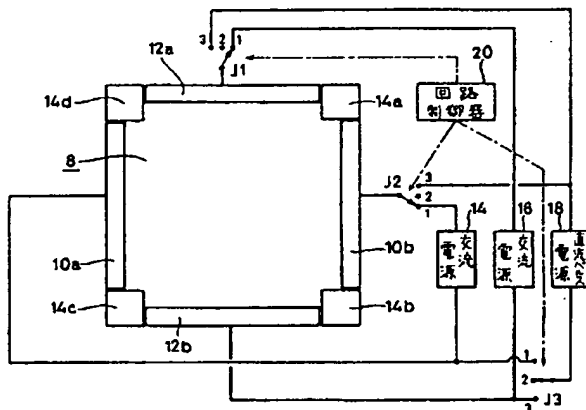
14, 16……交流電源、

18……直流パルス電源、

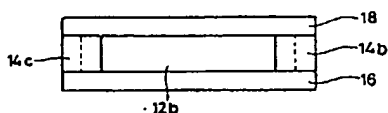
J1, J2, J3……スイッチ。

代理人 弁理士 野口繁雄

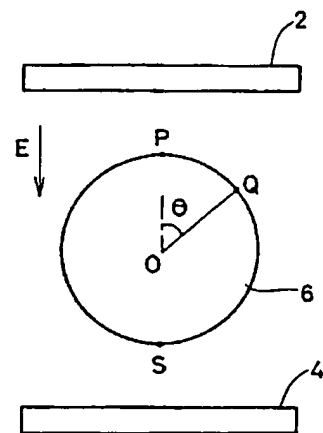
第1図



第2図



第3図



第1頁の続き

⑬発 明 者 望 月 崇 孝 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三
条工場内

⑭発 明 者 古 賀 守 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三
条工場内